ISSN 0073 - 9901
MIBUAH

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO BUTANTAN
SÃO PAULO, SP — BRASIL

Memórias do Instituto Butantan

VOLUME 54 NÚMERO 1, 1992

• NESTA EDIÇÃO
BOLETIM DE
BIOTECNOLOGIA, V. 3

As "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" têm por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos das Ciências Biológicas, Médicas e Químicas, elaborados por especialistas nacionais e estrangeiros.

São publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores.

The "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN" are the vehicle of comunication for original papers written by national and foreign specialists who contribute to the progress of Biological, Medical and Chemical Sciences.

They are published under the direction of the Editorial Board which assumes no responsability for statements and opinions advanced by contributors.

Indexado/Indexed: Biosis Data Base, Current Contents, Index Medicus.

Periodicidade: irregular
Permuta/Exchange: são feitas entre entidades governamentais, com publicações congêneres, mediante consulta prévia. Exchanges with similar publications can be settled with academic and governmental institutions through prior mutual agreement.
Endereço/Address. Instituto Butantan — Biblioteca. Av. Vital Brasil, 1.500
05503 — 900 São Paulo, SP — Brasil
Telefone/Telephone: (011)813-7222 — R. 129 — Telex: (011)83325 BUTA-BR
Telefax: (011)815-1505

Mem. Inst. Butantan
v.54, n. 1, 1992

SUMÁRIO/CONTENTS

Mem. Inst. Butantan
v. 54, n. 1, p.5-10, 1992

A PEPTIDE ISOLATED FROM BOVINE PLASMA, WHICH BEHAVES LIKE T-KININ.

L.A.F. FERREIRA *
L. J. GREENE **
O. B. HENRIQUES *

ABSTRACT: T-kinin (Ile-Ser-bradykinin) the unique natural homolog of bradykinin, was isolated from rat plasma and posesses pharmacological properties similar to those of kinins. However this kinin showed a greater depression of the rat blood pressure than that caused by bradykinin, Hiroshi and Greenbaum[5]. In this paper we describe the isolation of a peptide from bovine plasma that contracts the isolated rat uterus and decreases the blood arterial pressure of the rat and shows the same retention time of T-kinin on HPLC.

KEYWORDS: T-Kinin, bradykinin, bovine plasma.

INTRODUCTION

Kinins are usually defined as hypotensive polypeptides which contract most extravascular isolated smooth muscle preparations, but relax the rat duodenum. Kinins also increase vascular permeability, produce pain and have been found in mammals: bradykinin,lysyl-bradykinin(Kallidin), methionyl-lysyl-bradykinin(MLB) and T-Kinin. In spite of fact that bradykinin is a typical plasma kinin, the kinins mentioned above are generated from the following componente of blood: high molecular weight kininogen, low molecular weight kininogen and T-kininogen respectively, Pisano[8] and Okamoto and Greenbaum[7]

Since Elliot and Lewis isolated methionyl-lysyl-bradykinin(MLB) from bovine serum, concluding that the undecapeptide is formed as the result of activation of en-

* Serviço de Bioquímica — Laboratório Especial de Cininas Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1.500. 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
** Centro Interdepartamental de Química de Proteínas, Escola de Medicina da Universidade de São Paulo — Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
Supported by CNPq
Recebido para publicação em 13.5.91 e aceito em 31.3.92

dogenous enzymes in the bovine serum it is possible that in spite of the dialysis, a small amount of this peptide release at acid pH, remained adherent to the proteins present.

Okamoto and Greenbaum[7] isolated T-kinin from rat plasma after the incubation at pH 2 on absence of enzyme followed by pH 8 in the presence of tripsin-TPCK.

We used bovine plasma under conditions similar to those described by the authors mentioned above, and our experiments led us the separation of a peptide that behaves like T-kinin on HPLC chromatography and on Silica gel thin-layer chromatography shows the same Rf as T-kinin.

MATERIALS

Bradykinin (BK), T-Kinin (Ile-Ser-BK), Methionyl-lysÿl-Bradykinin(MLB), Kallidin, (LBK) were purchased from the Sigma Chemicals, St. Louis, Mo. Sephadex resins were Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala. Silica Gel G, type 60, was Merck Darmstadt.

METHODS

Measurement of Kinin activity.

Kinin activity was measured on isolated uterus of female rats (in estrus), weighing 180-200 g. A 1-2 cm lenght of uterus was suspended in a 5 ml muscle chamber with aerated Jalon Solution. To biological assay on isolated guinea-pig ileum (female guinea-pigs 160-180 g), Tyrode solution containing atropine (1 μg/ml) at 37°C was used, Dale[2].

Separation of the peptide.

The bovine plasma (900 ml) proteins were precipitated beteween 33 and 70% saturation with ammonium sulfate, separated by centrifugation and dissolved in 250 ml water. This solution was dialysed against 1 x 10^{-2}M HCl during 36 hours at pH 2.5 in the cold, and then lyophilized. The incubate (230 ml) then treated with three equivalent volumes of boiling ethanol, centrifuged, concentrated by evaporation on a Büchi Rotavapor and lyophilized (200 mg). The soluble material was dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7 and submitted to chromatography on a Sephadex G-75 column (2 x 100 cm), equilibrated with the same buffer (Fig. 1). The active fractions assayed on isolated guinea-pig ileum were mixed, lyophilized and (48 mg) were dissolved in 12 ml of 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7 and chromatographed on SP-Sephadex C-25 column (1 x 15cm) and the active fractions were eluted with the same buffer containing 0.12 M NaCl, (Fig. 2, according to Hial[4]. The total kinin activity measured on the isolated guinea-pig ileum was equivalent to 20 μg expressed as bradykinin.

HPLC separation of the active peak eluted of the SP-Sephadex C-25.

Separation of 15 μg of the active material eluted of the SP-Sephadex C-25 on the reverse-phase HPLC column (μ-Bondapack C_{18}, 300x 3.9 mm). Gradient system was 20%, acetonitrile/80% and orthophosphoric acid 15%. Flow rate was 1 ml/min.

Arterial Blood Pressure.

The carotide artery blood pressure of male rats (320 g), anesthetized with Nembutal (90 mg/kg), i.p., was recorded on a smoked drum, with the aid of a mercury manometer. Administration of drugs was through a polyethylene catheter introduced into the iliac vein.

Thin-Layer Chromatography of Kinins.

The mobility of the isolated peptide (2 μg) was compared to that of standard Kinins on Silica gel G plates by ascending chromatography. The method described by Sampaio[9] was followed using Silica gel with a mixture of chloroform, methanol and 17% ammonia (2 : 2 : 1) v/v, bradykinin (Bk), T-kinin, lysyl-bradykinin (LBK) and methionyl-lysyl-bradykinin (MLB).

RESULTS AND DISCUSSION

After the precipitation of the bovine plasma proteins with ammonium sulfate, incubation for 36 h at pH 2.5, ethanolic extraction, and two chromatographic steps, filtration and ion exchange, followed by HPLC chromatography (Fig. 1,2 and 3A), we found an active peptide that corresponds to the standard T-kinin peak on HPLC (Fig. 3B). The isolated peptide from bovine plasma showed to be active on the isolated rat uterus (Fig. 3C), and on the isolated guinea-pig ileum.

When the isolated peptide (7 μg/Kg) and T-kinin (1.8 and 3.7 μg) were paralelly injected, intravenously into the rat, a decrease of the blood pressure was observed (Fig. 4).

The isolated peptide showed a Rf value (6 cm) similar to that of T-kinin when standard kinins were submitted to silica-gel thin-layer chromatography, (Fig. 5).

The present study demonstrates that a peptide with some kinin properties was isolated from bovine plasma at pH 2,5 in absence of enzyme addition. The here described peptide, might have been released by a plasma protease, which has been activated during the incubation at pH 2.5, as it is known that the T-kinin liberating enzymes are active in inflammatory processes during which the pH might be alterated.

Apart of that, in this conditions the kinins substrates levels are also increased, Barlas[1]. According with the results above, there are evidences that this peptides shows characteristics of the T-kinin in spite the fact that only two substrats that generate the kinins are know in bovine plasma: low and hight molecular weight kininogens, Kato[6].

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Maria Amélia Gomes Ferreira for typing the manuscript.

RESUMO: Os autores descrevem o isolamento de um peptídio de plasma bovino, que possui propriedades farmacológicas das cininas; Apresenta o mesmo valor de Rf da T-cinina em cromatografia em camada delgada de silica gel e é eluído no mesmo tempo de retenção da T-cinina em Hight Performance Liquid Chromatography (HPLC).

UNITERMOS: T-cinina, bradicinina, plasma bovino.

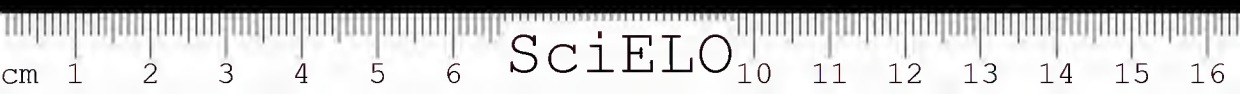
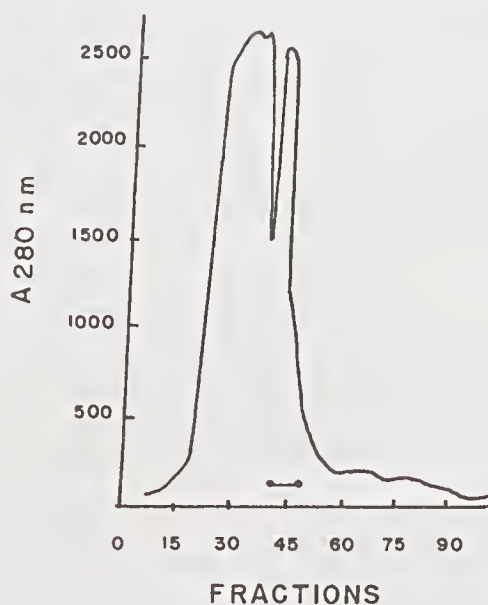



Fig. 1. Chromatography on Sephadex G-75 column (2 x 100 cm) of 200 mg dry ethanolic extract equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7. Fraction volume 3 ml. (____) Absorbance 280 nm; (•——•) Bradykinin equivalent activity.

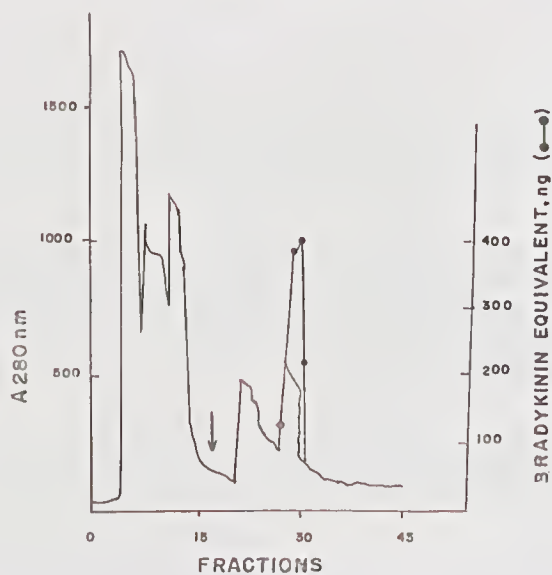



Fig. 2. Chromatography on SP-Sephadex C-25 column (1 x 15 cm) of 48 mg active fractions obtained from Sephadex C-75 column. Buffer: Tris-HCl 20 mM, pH 7. Arrow: stepwise elution with 0.12 M NaCl in same buffer. Fraction volume 2 ml. (____) Absorbance 280 nm; (•——•) Bradykinin equivalent activity.

FERREIRA, L.A.F., GREENE, L.J., HENRIQUES, O.B. A peptite isolated from bovine plasma, which behaves like T-Kinin. Mem. Inst. Butantan, v. 54, n. 1, p.5-10, 1992.

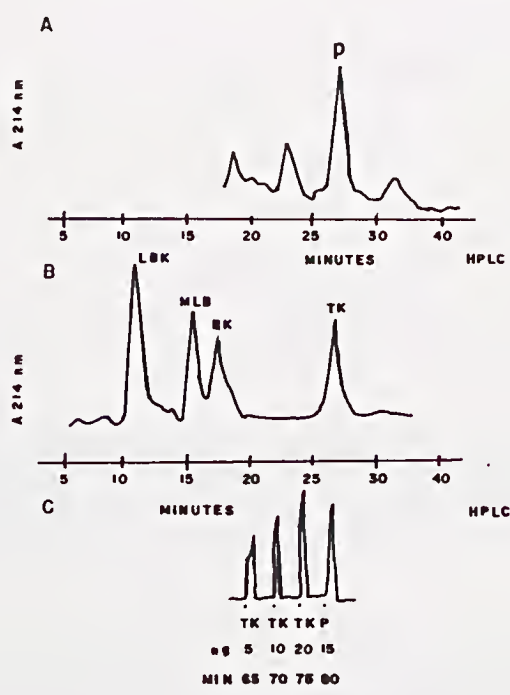



Fig. 3. A-B Isolation of the active peptide (10 μg) on a reverse-phase HPLC column (μBondapack C_{18}, 300 x 3.9 mm). Gradient system: 20%, Acetonitrile/80% and orthophosphoric acid 15%. Flow rate was 1 ml/min. C Activity of the isolated peptide (P) on the isolated rat uterus; n = 4.

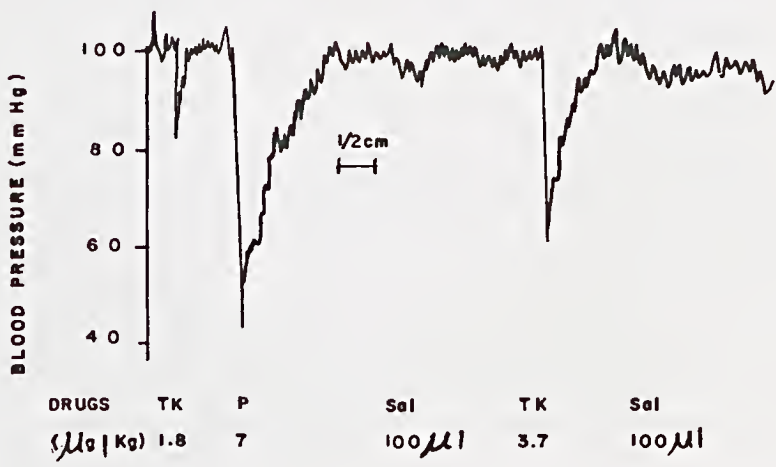



Fig. 4. Action of the peptide (P) and Bradykinin (BK) upon rat arterial blood pressure; n = 3.

FERREIRA, L.A.F., GREENE, L.J., HENRIQUES, O.B. A peptite isolated from bovine plasma, which behaves like T-Kinin. **Mem. Inst. Butantan**, v. 54, n. 1, p.5-10, 1992.

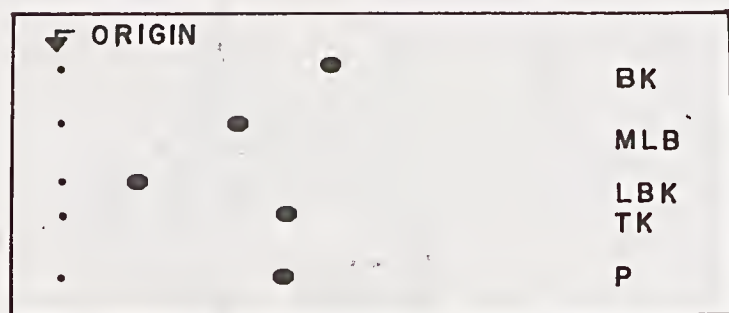



Fig. 5. Thin-Layer silica gel plate of 2 μg of the isolated peptide and 2 μg of standard kinins: Bradykinin (BK), methionyl — lysyl-bradykinin (MLB), lysyl-bradykinin (LBK) and T-kinin (TK). Solvent system: chloroform-methanol-17% ammonia v/v: (2 : 2: 1).

REFERENCES

1. BARLAS, A., OKAMOTO, H., GREENBAUM, L.M. T-Kinin: The major plasma kininogen in rat adjuvant arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. *129*, p. 280-286, 1985.
2. DALE, H.H. The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea-pig. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, v. *4*, p. 167, 1912/13.
3. ELLIOT, D.F. & LEWIS, G.P. Methionyl-lysyl-bradykinin, a new kinin from ox blood. *Biochem. J.*, v. *95*, p. 437-447, 1965.
4. HIAL, V., KEISER, H.R., PISANO, J.J. Origin and content of methionyl-lysyl-bradykinin, lysyl-bradykinin and bradykinin in human urine. *Biochem. Pharm.*, v. *25*, p. 2499 — 2503, 1976.
5. HIROSHI, O. & GREENBAUM, L.M. Pharmacological properties of T-kinin from rat plasma. *Biochem. Pharm.*, v. *17*, p. 2637-2638, 1983.
6. KATO, H., NAGASAWA, S., IWANAGA, S. HMW and LMW kininogens. In: LORAND, L., ed. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 1981. v. *80*, part C, p. 172-98.
7. OKAMOTO, H. & GREENBAUM, L.M. Isolation and structure of T-kinin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. *122*, p. 701-708, 1983.
8. PISANO, J.J. Kinins in nature. In: ERDOS, E.G., ed. *Bradykinin, kallidin and Kallikrein.* Berlin: Springer-Verlag, 1979. p. 273-85 (Handbook of experimental pharmacology, 25, supplement)
9. SAMPAIO, C.A.M., NUNES, S.T., MAZZACORATTI, M.G.N., PRADO, J.L. Inactivation of kinins by chymotrypsin. *Biochem. Pharm.*, v. *25*, p. 2391 — 2394, 1976.

Mem. Inst. Butantan
v. 54, n. 1, p.11-19, 1992

OBSERVAÇÕES SOBRE CICLO EVOLUTIVO DE *TRIATOMA VITTICEPS* (STAL,1859) ALIMENTADOS A INTERVALOS CONTROLADOS EM POMBOS OU COELHOS. (HEMIPTERA-REDUVIIDAE-TRIATOMINAE).

Ana Maria MARASSÁ*

RESUMO: Foram feitas observações comparativas quanto ao desenvolvimento de *Triatoma vitticeps*. Os exemplares foram criados em laboratório em condições ambientais de temperatura e umidade. Foram separados 160 exemplares, ninfas recém-eclodidas, formando-se 8 grupos alimentados respectivamente em coelhos ou pombos, obedecendo-se a intervalos de 7,14,21 e 28 dias entre os repastos. Os exemplares foram observados durante o período de novembro de 87 a julho de 1990. Pode-se constatar um período de vida ninfal mais curto no lote alimentado em coelhos com intervalo de 7 dias, e mais longo em exemplares alimentados em pombos a cada 28 dias; entretanto não se observaram diferenças entre exemplares alimentados a intervalos de 14 e 21 dias.

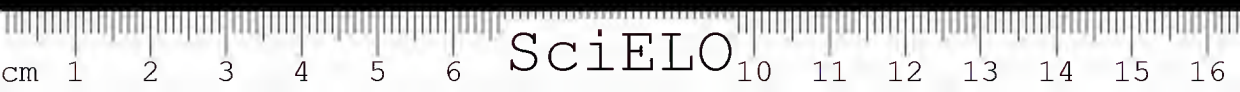
UNITERMOS: *Triatoma vitticeps,* alimentação.

INTRODUÇÃO

Dando prosseguimento à série de trabalhos bionômicos sobre triatomíneos vetores da Doença de Chagas, observações foram realizadas quanto ao comportamento de *Triatoma vitticeps* face a um regime com intervalos controlados de alimentação efetuada respectivamente em coelhos ou pombos.

T.vitticeps, além de ser vetor da Doença de Chagas, encontra-se em fase inicial de transição de ambiente silvestre para domiciliar em determinadas regioẽs do país, como citado por Barreto [1] e Silveira et al [10], daí o interesse em aprofundar os conhecimentos sobre a espécie.

* Seção de Parasitologia
Instituto Butantan C.P. 65 — 05503-900 — São Paulo — SP
Recebido para publicação em 06.12.90 e aceito em 06.12.91.

MARASSÁ, A.M. Observações sobre ciclo evolutivo de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) alimentados a intervalos controlados em pombos ou coelhos. (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). **Mem. Inst. Butantan, v.54**, n.1, p.11-19, 1992.

Estudos publicados por Corrêa[2], Juarez[7], Costa et al[3], Diotaiuti et al[4] e Jurberg & Rangel[8] com exemplares de *T. infestans, D. maximus, R. neglectus* e *R. pallescens* contribuem com informações quanto ao conhecimento dessas espécies em relação à influência da alimentação em diferentes animais em laboratório.

Dado o encontro de *T.vitticeps* na natureza, quer seja coabitando com diferentes animais, roedores ou marsupiais ou mesmo nas proximidades de domicílios, procurou-se nesta observação associar diferentes fontes alimentares a intervalos de tempo, com objetivo de adequar um melhor intervalo entre os repastos, facilitando o manuseio e conseqüentemente com resultados referentes ao desenvolvimento da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Dada a adaptação de *T. vitticeps* às condições ambientais do Laboratório da Seção de Parasitologia do Instituto Butantan, exemplares desta espécie, descendentes de uma fêmea recebida de Vila Velha, ES vêm sendo criados desde 1974.

Em novembro de 1987 foram separados 160 exemplares, ninfas recém-eclodidas, divididas em 8 grupos de 20 exemplares cada. Para comparação 4 grupos foram alimentados em coelhos e 4 em pombos.

Os grupos tiveram alimentação controlada, obedecendo-se intervalos de freqüência de 7,14,21 e 28 dias em cada uma das fontes alimentares.

A alimentação dos grupos de mesmo intervalo de freqüência foi simultânea, tendo os repastos, tanto em pombos quanto em coelhos, duração de 20 minutos.

Os insetos foram criados individualmente em frascos de Borrel, em condições ambientais de temperatura e umidade. As temperaturas mínima/máxima, bem como a umidade relativa foram observadas diariamente entre 9:00 e 10:00 h. A variação de temperatura mínima no período de Novembro 87 — Julho 90 foi de 8,5°C — 25°C; a variação de temperatura máxima no mesmo período foi de 11°C — 29°C e a Umidade Relativa de 41 — 99%.

Neste experimento a Análise Estatística Inferencial foi realizada através das técnicas de Análise de Variância, Regressão Linear Múltipla e Teste de Tukey. Para cada um dos estádios evolutivos foi feita Análise de Variância de dois fatores: 1) Grupo:Coelho/Pombo e 2) Dias: 7/14/ 21/28.

Para homogeneizar as variâncias das combinações de tratamentos para cada estádio, a análise foi realizada com o logarítmo natural dos dados originais. Em casos onde se observou diferente número de respostas para cada combinação de tratamento, foi utilizada a técnica de Regressão Linear Múltipla. Para realizar as comparações múltiplas foi utilizado o teste de Tukey (alfa = 5%) dentro de cada grupo, sendo apresentada também a significância descritiva (p)em cada teste.

RESULTADOS

Das 160 ninfas observadas, foram consideradas para análise geral apenas as que participaram no experimento desde o primeiro estádio até adulto. Os exemplares foram observados no período de novembro de 1987 a julho de 1990, data da última ecdise realizada.

A menor duração do período ninfal foi de 368 dias com ninfa alimentada em coelhos a intervalos de 7 dias e a maior foi de 962 dias com exemplar alimentado em pombos a intervalos de 21 dias.

As durações mínimas, máximas e médias (em dias), em cada estádio evolutivo, referentes a cada grupo alimentado em coelhos ou pombos nos intervalos de 7, 14, 21 e 28 dias são apresentadas nas Tabelas 1 a 4.

Considerando-se as médias, observou-se que exemplares alimentados em coelhos a intervalos de 7,14,21 e 28 dias apresentaram duração do ciclo evolutivo de 395, 5; 458, 8; 514,3; 572,1 dias enquanto que os alimentados em pombos, os períodos corresponderam respectivamente a 503, 1; 621, 5; 593, 4 e 679, 7 dias (Vide Tabelas)

Com as médias e desvios padrões das Tabelas 1 a 4 foram construídos os Gráficos 1 a 4.

Nos Gráficos 1 a 4 estão representados os perfis médios das 8 combinações de tratamento: alimentação/intervalo de alimentação; ou seja alimentação em coelhos ou pombos a intervalos de 7,14,21 e 28 dias respectivamente.

Observou-se que a duração em dias aumentou gradativamente a medida que os estádios foram sucedendo, mas o Estádio IV em geral apresentou duração semelhante ao Estádio V.

À medida que os estádios evolutivos avançaram houve aumento da variabilidade (representada por barras verticais nos gráficos), nos grupos alimentados em coelhos e pombos, sendo maior nestes últimos.

Com exceção do Estádio II, observou-se que as médias de duração em dias foram maiores para os exemplares alimentados em pombos (linhas tracejadas).

Para cada estádio evolutivo foi feita Análise de Variância de dois fatores: 1) Grupo: Coelho/Pombo 2) Dias: 7/14/21/28 e para realizar as comparações múltiplas foi utilizado o teste de Tukey, sendo os resultados a seguir apresentados:

Para o Estádio I observou-se:

1 — Existe diferença significativa entre as médias do grupo alimentado em coelho e em pombo, ($p < 5\%$) para todos os intervalos de alimentação ($p=0,0196$).

2 — Existem diferenças significantes ($p < 1\%$) entre os intervalos de alimentação (dias) ($p=0,0000$). Ao aplicar-se o teste de Tukey constatou-se diferença significante entre a média dos exemplares alimentados a cada 7 dias e outros dias e entre os alimentados a cada 14 e 28 dias.

3 — Ao comparar-se os dois grupos verificou-se que apresentaram comportamento semelhante em relação aos intervalos de alimentação ($p=0,8523$).

Para o Estádio II verificou-se:

1 — Não existe diferença significativa entre as médias globais do grupo alimentado em coelho e em pombo ($p=0,6834$).

2 — Existem diferenças significantes entre as médias globais nos diferentes dias ($p=0,0000$). Para explorar um pouco mais a diferença entre as médias foi aplicado o teste de Tukey em cada grupo e observou-se diferença significativa entre a média dos exemplares alimentados em coelho a cada 7 dias e aqueles alimentados a cada 14 e 21 dias e entre a média dos alimentados em coelho a cada 21 e 28 dias.

Nos exemplares alimentados em pombos observou-se diferença significativa entre a média dos alimentados a cada 7 dias e aqueles alimentados a cada 21 dias assim como entre a média dos alimentados respectivamente a cada 14 e 21 dias.

3 — Ao comparar-se os dois grupos observou-se indícios de comportamento diferente em relação aos intervalos de alimentação ($p=0,0684$).

Para o Estádio III verificou-se:

1 — Existe diferença significativa entre as médias do grupo alimentado em coelho e em pombo ($p < 1\%$) ($p=0,0080$), para todos os intervalos de alimentação.

2 — Existem diferenças significantes ($p < 1\%$) ($p=0,0000$) entre as médias nos diferentes dias. Ao aplicar o teste de Tukey observou-se diferença entre a média dos exemplares alimentados a cada 7 dias e aqueles alimentados a cada 21 e 28 dias.

3 — Ao comparar-se os dois grupos verificou-se que apresentaram comportamento semelhante em relação aos intervalos de alimentação (p=0,2499).

Para o Estadio IV observou-se:

1 — Existe diferença significativa entre as médias do grupo alimentado em coelho e em pombo (p < 1%) (p=0,0000).

2 — Existem diferenças significantes (p < 1%) (p=0,0000) entre as médias nos diferentes dias. Para verificar a diferença entre as médias foi utilizado o teste de Tukey em cada grupo e observou-se diferença entre a média dos exemplares alimentados em coelho a cada 7 dias em relação aos demais dias.

Houve diferença entre a média dos exemplares alimentados em pombos apenas entre 14 e 28 dias.

3 — Os dois grupos apresentaram comportamento diferente em relação aos intervalos de alimentação (p=0,0000).

Para o Estádio V os cálculos foram feitos através do enfoque de Regressão Linear Múltipla dada a observação do diferente número de respostas para cada combinação de tratamento e constatou-se:

1 — Existe diferença significativa entre (p < 1%) (p=0,0035) entre as médias do grupo alimentado em coelho e em pombo.

2 — Existem diferenças significantes (p < 1%) (p=0,0000) entre as médias nos diferentes dias. Para testar a diferença entre as médias foi utilizado o teste de Tukey. Verificou-se que não existe diferença significativa entre as médias nos diferentes intervalos nos exemplares alimentados em coelho.

Nos exemplares alimentados em pombo observou-se diferença significativa entre a média dos exemplares alimentados a cada 7 dias e aqueles alimentados a cada 28 dias.

3 — Os dois grupos apresentaram comportamento diferente em relação aos intervalos de alimentação (p < 1%) (p=0,0008).

Ao considera-se a duração do período ninfal, os cálculos foram obtidos através do enfoque de Regressão Linear Múltipla pelos mesmos motivos citados no Estádio V e verificou-se:

1 — Existe diferença significativa entre as médias dos grupos alimentados em coelho e em pombo (p < 1%) (p=0,0000).

2 — Existem diferenças significantes entre as médias nos diferentes dias (p < 1%) (p=0,0000). Foi utilizado o teste de Tukey e verificou-se diferença entre a média dos exemplares alimentados a cada 7 dias em relação aos demais e entre a média dos alimentados a cada 28 dias em relação aos demais. Não houve diferença significativa entre as médias dos exemplares alimentados a cada 14 dias em relação àqueles alimentados a cada 21 dias.

3 — Os dois grupos apresentaram comportamento semelhante em relação aos intervalos de alimentação (p=0,2552).

DISCUSSÃO

Corrêa[2] ao alimentar *T. infestans* em galinha, gambá ou cão, obteve uma duração total do ciclo evolutivo maior em cão, mas ao comparar exemplares alimentados em galinha ou em gambá não encontrou diferença.

Juarez[7] avaliou o comportamento de *T. infestans* submetido a ação de três variáveis; temperatura, fonte sangüínea e infecção pelo *T. cruzi.* Ao comparar as fontes de sangue, galinha e camundongo, obteve um encurtamento do ciclo evolutivo em exemplares alimentados em camundongos, o mesmo ocorreu com aumento da temperatura.

Juberg & Rangel [8] estudando o ciclo biológico de *R.pallescens* em diversas condições de temperatura, umidade, e luminosidade, alimentados em pombos ou camundongos, constataram uma preferência alimentar por camundongo.

Diotaiuti et al [4] observou que à 27 ± 2°C e 70% de UR, exemplares de *R. neglectus* alimentados em pombos ou camundongos apresentaram desenvolvimento mais rápido quando alimentados nestes últimos.

Costa et al [3] obteve resultados semelhantes com *D.maximus*, mantidos em estufa a 28°C e 65% UR.

Gonçalves et al [5] obteve adultos *T. vitticeps* num intervalo de 180 a 372 dias a temperaturas de 25 ± 2°C a 28 ± 2°C e UR de 80 ± 2% com alimentação semanal em camundongos.

Silva[9] observou um período de desenvolvimento menor em condições de temperatura que variaram de 25 ± 0,5°C e 30 ± 1°C. alimentando em galinhas.

Heitzmann-Fontenelle[6] observou vida ninfal de 379 a 781 dias oferecendo alimentação em coelhos, a intervalos que variaram de 7 a 10 dias.

Nesta observação, com exemplares mantidos em temperatura ambiente, foram obtidos adultos cujo ciclo evolutivo foi acentuadamente maior do que os verificados por Silva[9] e Gonçalves et al[5]. Os resultados encontrados para exemplares alimentados em coelhos ou pombos a cada 7 dias ou 14 dias, foram semelhantes aos obtidos por Heitzmann-Fontenelle.

O prolongamento do período ninfal deve ser relacionado à variação individual e a fatores extrínsecos, temperatura e umidade, que tiveram variação durante todo o período de observação. A estes fatores deve-se acrescentar o estabelecimento de longo tempo de criação da colônia em laboratório. Deve-se destacar porém o desenvolvimento mais rápido em exemplares alimentados em coelhos, resultados estes compatíveis com os obtidos por Diotaiuti et al[4], Costa et al[3] e demais autores. No entanto não se pode afirmar uma maior adaptação dos exemplares alimentados em coelhos.

CONCLUSÃO

Ao comparar os dois grupos em observação constatou-se:

1 - Um desenvolvimento mais rápido nos grupos alimentados em coelho em todos os intervalos de freqüência em todo ciclo evolutivo com exceção ao Estádio II.

2 - Não haver diferença significativa na duração do ciclo evolutivo dos exemplares alimentados em coelhos ou pombos a intervalos de 14 e 21 dias.

3- Menor variabilidade de intermuda nos grupos alimentados em coelho. De modo geral ao comparar-se as médias dos períodos de desenvolvimento observou-se que a alimentação em coelho favoreceu o desenvolvimento de *T.vitticeps.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Therezinha H.Fontenelle pela orientação e ao Prof. Dr. Fernando M.A.Corrêa pela leitura crítica do texto e sugestões.

ABSTRACT: Comparative observations were made on the development of *Triatoma vitticeps.* Specimens were maintained under variable laboratory conditions (temperature and humidity). Eight groups from 160 hatched nimphs were formed. They were fed respectively on rabbits or pigeons. Feeding intervals of 7, 14,21 and 28 days were established. Observations were made from November 1987 to July 1990. Insects

fed on rabbits in intervals of 7 days showed the shortest growing period meanwhile those fed on pigeons in intervals of 2B days took longer to develop. There was no difference between those fed in intervals of respectively 14 and 21 days.

KEYWORDS: *Triatoma vitticeps,* feeding

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRETO, M.P. Ecologia de triatomíneos e transmissão do *Trypanosoma cruzi*, com especial referência ao Brasil. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, v. *10*, p.339-353, 1976.
2. CORRÊA, F.M.A. Estudo comparativo do ciclo evolutivo do *Triatoma infestans* Klug, 1B34 alimentado em diferentes animais. Ribeirão Preto, 1961. (Tese de Doutoramento — Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP).
3. COSTA, J.M., JURBERG, J., ALMEIDA, J.R. Estudos bionômicos de *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894) (Hemiptera-Triatominae). II. Influência da dieta sobre o ciclo biológico e resistência ao jejum. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.*82*, p.111-11B, 19B7.
4. DIOTAIUTI,L. & DIAS,J.C.P. Estudo comparativo do ciclo evolutivo de *Rhodnius neglectus* alimentados em pombos e camundongos. *Rev. Soc. bras. Med. trop.*, v.*20*, p.95-100, 19B7.
5. GONÇALVES, T.C.M., VICTÓRIO, V.M.N., JURBERG, J., CUNHA V. Biologia do *Triatoma vitticeps* (Stal, 1B59) em condições de laboratório (Hemiptera-Reduviidae--Triatominae) I. Ciclo evolutivo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.*83*, p.519-523, 19BB.
6. HEITZMANN-FONTENELLE, T.J. Bionomia comparativa de triatomíneos. IV. *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) (Hemiptera-Reduviidae). *Ecossistema*, v.*5*, p.39-46, 1980.
7. JUAREZ, J.E. Comportamento do *Triatoma infestans* sob várias condições de laboratório. *Rev. Saúde públ.*, v.*4*, p.147-166, 1970.
B. JURBERG, J. & RANGEL, E.F. Ciclo biológico de *Rhodnius pallescens* Barber, 1932 (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae) em Laboratório. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.*79*, p.303-308, 19B4.
9. SILVA, I.G. da. Influência da temperatura na biologia de 1B espécies de triatomíneos (Hemiptera-Reduviidae) e no Xenodiagnóstico. Curitiba, 1985 (Tese de Mestrado--Universidade Federal do Paraná).
10. SILVEIRA, A.C., ALENCAR, T.A., MÁXIMO, M.H.C. Sobre o *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) no Espírito Santo, Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DE PESOUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 10, Caxambu, 1983. *Resumos*... v. 16.

MARASSÁ, A.M. Observações sobre ciclo evolutivo de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) alimentados a intervalos controlados em pombos ou coelhos. (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). **Mem. Inst. Butantan, v.54**, n.1, p.11-19, 1992.

TABELA 1
Duração do ciclo evolutivo em triatomíneos alimentados em coelhos ou pombos a cada 7 dias.

Estádio	Coelhos N	Coelhos X	Coelhos D.P.	Coelhos Min	Coelhos Max	Pombos N	Pombos X	Pombos D.P.	Pombos Min	Pombos Max
I	18	29,5	4,3	23	37	18	31,4	4,3	27	40
II	18	36,8	4,5	28	47	18	38,9	7,9	30	67
III	18	46,5	5,6	40	63	18	58,7	15,3	40	96
IV	18	100,1	35,5	73	226	18	224,9	57,4	87	380
V	18	182,6	33,6	122	247	17	151,4	48,6	95	269
Total	18	395,5	34,6	368	469	17	503,1	73,1	447	772

N = número de exemplares
X = media
D.P. = desvio padrão

TABELA 2
Duração do ciclo evolutivo em triatomíneos alimentos em coelhos ou pombos a cada 14 dias.

Estadio	Coelhos N	Coelhos X	Coelhos D.P.	Coelhos Min	Coelhos Max	Pombos N	Pombos X	Pombos D.P.	Pombos Min	Pombos Max
I	18	33,9	6,5	22	47	18	40,1	8,8	27	59
II	18	47,5	13,1	36	80	18	41,2	10,1	30	62
II	18	58,4	13	41	84	18	60,1	14,6	39	91
IV	18	175,6	32	101	219	18	227,1	47,6	124	312
V	18	142,9	32,9	67	218	17	250,6	117,7	88	422
Total	18	458,8	36	385	530	17	621,5	154,2	415	856

N = número de exemplares
X = média
D.P. = desvio padrão

MARASSÁ, A.M. Observações sobre ciclo evolutivo de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) alimentados a intervalos controlados em pombos ou coelhos. (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). **Mem. Inst. Butantan, v.54**, n.1, p.11-19, 1992.

TABELA 3
Duração do ciclo evolutivo em triatomíneos alimentados em coelhos ou pombos a cada 21 dias.

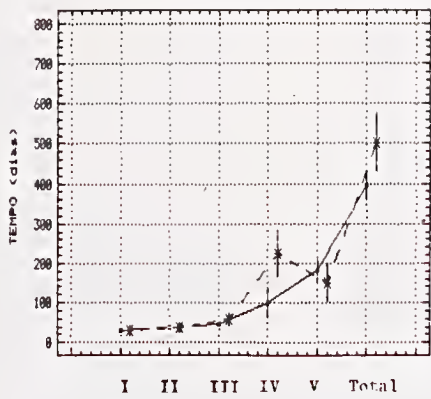
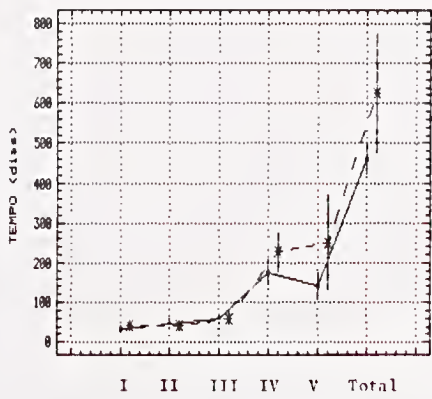
	Coelhos					Pombos				
Estádio	N	X	D.P.	Min	Max	N	X	D.P.	Min	Max
I	18	38,8	9	23	45	18	42,5	12,1	26	62
II	18	53,2	11,8	39	85	18	49,2	8,6	31	67
III	18	65,8	19,4	33	118	18	68,7	17,4	45	118
IV	18	169,2	23,8	125	223	18	197,2	37,5	134	286
V	18	187,3	81	129	415	17	235,1	123,5	121	531
Total	18	514,3	85,4	444	751	17	593,4	138,8	474	962

N = número de exemplares
X = média
D.P. = desvio padrão

TABELA 4
Duração do ciclo evolutivo em triatomíneos alimentados em coelhos ou pombos a cada 28 dias.

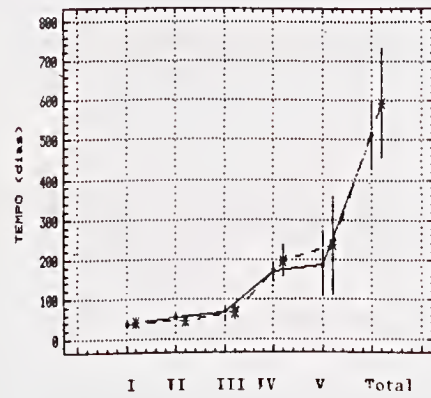
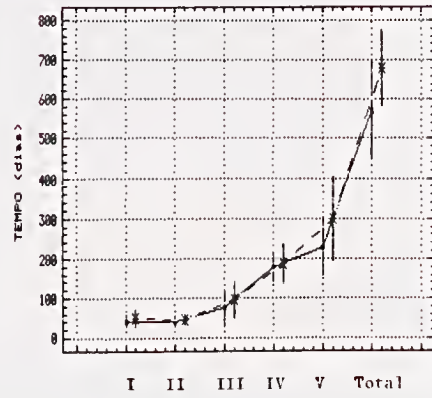
	Coelhos					Pombos				
Estádio	N	X	D.P.	Min	Max	N	X	D.P.	Min	Max
I	18	44,2	12,5	22	87	18	50,5	19,7	22	87
II	18	42,0	10,6	29	63	18	46,8	11,9	29	63
III	18	76,6	45,4	44	194	18	97,5	45,2	44	194
IV	18	178,4	37,8	86	288	18	186,7	50,2	86	288
V	18	229,2	71,7	108	523	18	298,2	104	108	523
Total	17	572,1	120,7	474	832	18	679,7	96,8	474	832

N = número de exemplares
X = média
D.P. = desvio padrão

MARASSÁ, A.M. Observações sobre ciclo evolutivo de *Triatoma vitticeps* (Stal, 1859) alimentados a intervalos controlados em pombos ou coelhos. (Hemiptera-Reduviidae-Triatominae). **Mem. Inst. Butantan**, v.54, n.1, p.11-19, 1992.

ESTÁDIOS EVOLUTIVOS

Graf. 1 Duração do ciclo evolutivo de *T. vitticeps* alimentados em coelhos ou pombos a cada 7 dias.

ESTÁDIOS EVOLUTIVOS

Graf. 2 Duração do ciclo evolutivo de *T. vitticeps* alimentados em coelhos ou pombos a cada 14 dias.

ESTÁDIOS EVOLUTIVOS

Graf. 3 Duração do ciclo evolutivo de *T. vitticeps* alimentados em coelhos ou pombos a cada 21 dias.

ESTÁDIOS EVOLUTIVOS

Graf. 4 Duração do ciclo evolutivo de *T. vitticeps* alimentados em coelhos ou pombos a cada 28 dias.

Coelhos ————

Pombos – – – –

Mem. Inst. Butantan
v. 54, n. 1, p.21-30, 1992

DOSAGEM BIOLÓGICA DO ANTIVENENO BOTRÓPICO

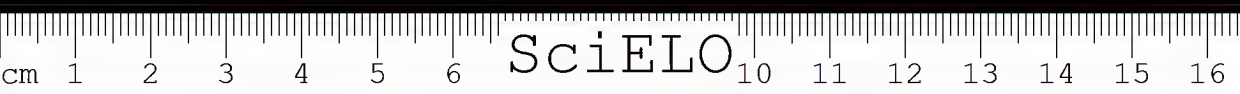
Sérgio Luiz DALMORA*
Silvana F. VACCARI**
Alexandre M. SAMPEDRO***
João Eduardo da S. PEREIRA****

ABSTRACT: The determination of the LD50 of bothropic reference venom and the evaluation of the respective antivenin potency were standardized by intraperitoneal inoculation in mice. The computer program was developed for the calculations of the LD50 and the potency (ED50) by probit analysis. The final results were consistent and reproducibles. The weight obtained in independent assays was between 374 and 1762. The precision index was $\lambda < 0,10$.

KEYWORDS: Bothropic antivenins and venom, evaluation of bothropic antivenin potency, LD50 of bothropic venom.

INTRODUÇÃO

O método de Vital Brazil [2] foi empregado durante muitos anos para a titulação da atividade tóxica de venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, e para a determinação da potência dos antivenenos botrópicos. Para a avaliação da potência o procedimento fundamenta-se na incubação da mistura veneno-antiveneno a 37°C, durante 30 minutos e inoculação por via endovenosa em pombos. O período de observação, de 20 a 30 minutos, não possibilita quantificar os anticorpos antitóxicos, mas aqueles específicos à atividade coagulante.[14,16]. O número

φ Financiado pela SCT/MS.
* Prof. Tit. Deptº de Farmácia Industrial — CCS — UFSM
** Méd. Vet. do Deptº de Farmácia Industrial — CCS — UFSM
*** Engº do Núcleo de Processamento de Dados — UFSM
**** Auxiliar-de-Ensino do Deptº de Estatística — CCNE — UFSM
* Departamento de Farmácia Industrial
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Maria
Campus Universitário — 97119 — Santa Maria — RS
Recebido para publicação em 30.07.1991 e aceito em 29.10.91.

de respostas para cada nível de diluição é pequeno e a análise estatística dos dados é restrita, influenciando assim a precisão das estimativas de potência. A Farmacopéia Brasileira[7] preconiza esta metodologia.

Em 1937, Slotta e Syszka[18] realizaram ensaios com a finalidade de padronizar a utilização de camundongos para o estudo da atividade tóxica de venenos ofídios. Kocholaty e cols.[13] testaram diferentes vias de administração demonstrando que as vias intravenosa e intraperitoneal propiciavam procedimentos adequados e reprodutíveis para o doseamento de antivenenos. Observaram, inclusive, que a via de inoculação teria importância decisiva na demonstração do efeito protetor na interação veneno-antiveneno, que por sua vez variaria de acordo com o tipo de veneno. Furlaneto e cols.[10, 11] destacaram as vantagens deste animal e realizaram experimentos empregando a via endovenosa e doses preparatórias de veneno para a determinação da DL50 de venenos botrópicos. Siles Vilarroel e cols.[16] obtiveram bons resultados efetuando a titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos pela via intraperitoneal em camundongos. Concluiram também que o método preenchia os requisitos necessários à quantificação, em termos de DL50, dos fatores responsáveis pela toxicidade com alto grau de sensibilidade e de reprodutividade, isento dos inconvenientes devidos ao fator coagulante. Os mesmos autores[14,15] numa etapa seguinte, padronizaram a metodologia para a avaliação da potência de antivenenos botrópicos, comprovando a eficiência do modelo experimental e demonstrando que a inoculação intraperitoneal era um processo plenamente satisfatório, e perfeitamente reprodutível.

Ao verificar as metodologias preconizadas pelos autores[12, 17, 19, 20] para a determinação da capacidade neutralizante dos soros anti-ofídicos, encontra-se ensaios biológicos fundamentados nas atividades: letal, hemorrágica, edemaciante, coagulante, miotóxica, necrosante, desfibrinante e enzimáticas. Por sua vez, as Farmacopéias Européia[6] e Britânica[3] recomendam a utilização do camundongo como animal de prova para a determinação da Dose Letal 50 do veneno e, a seguir, a avaliação da potência do antiveneno respectivo em relação à toxicidade encontrada.

Para o ensaio biológico que se fundamenta na determinação da atividade letal há dois procedimentos: 1º) mistura de quantidades fixas de veneno com diluições variáveis do antiveneno[3, 4, 6] e 2º) mistura de doses diferentes de veneno e quantidades constantes de soro[4, 13, 14]. Em ambos os casos realiza-se incubação prévia a 37°C durante 30 minutos, antes da inoculação.

Este trabalho tem por finalidade padronizar a metodologia para a avaliação da potência do antiveneno botrópico pela via intraperitoneal em camundongos. Efetuar a análise estatística dos dados pelos métodos de probitos demonstrando a validade, a exatidão e a reprodutibilidade dos ensaios.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Veneno de Referência

Foi utilizado o veneno de *Bothrops jararaca* como veneno de referência, lote BRA/Bot/001., cedido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde — INCQS. Cada frasco contém 30mg de veneno — 900 DL50 — e foi conservado a -20°C. Foram preparadas soluções de veneno na concentração de 10mg/ml em solução fisiológica estéril.

2. Antivenenos Botrópicos

Foram utilizados três lotes de antivenenos botrópicos fornecidos pelo Instituto Butantan de São Paulo e Instituto Vital Brazil do Rio de Janeiro e identificados como antiveneno A,B,C.

3. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, de ambos os sexos, com peso entre 18 e 20g. Os animais foram mantidos em jejum de 10 a 15 horas com acesso à glicose a 10%. Para o ensaio, foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 6 a 10 animais cada um, e identificados segundo a dose a ser injetada.

4. Determinação da Dose Letal 50 (DL50)

Foram preparadas 4 doses de veneno de *B. jararaca* diluído em solução fisiológica estéril segundo uma progressão geométrica com espaçamento logarítmico constante igual a 0,1.

Injetou-se 0,5ml por camundongo pela via intraperitoneal. Os animais foram observados durante 48 horas, registrando-se número de mortes para cada dose.

5. Avaliação da potência do antiveneno botrópico.

Preparou-se a solução do veneno de referência de *B. jararaca* em solução fisiológica estéril, de modo a conter 20 DL50 de veneno por ml.

Segundo a potência suposta de cada soro antibotrópico foram preparadas quatro diluições em solução fisiológica estéril formando uma progressão geométrica com espaçamento logarítimo igual a 0,097.

Transferiu-se 3ml de cada uma das diluições do antiveneno para tubos de ensaio com tampa, aos iguais adicionou-se 3ml da solução do veneno. Homogeneizou-se. Os tubos foram incubados a 37°C, em banho-maria, durante 30 minutos.

Administrou-se 0,5ml da respectiva dose, pela via intraperitoneal, em camundongos. Os animais foram observados durante 48 horas, registrando-se o número de mortes para cada dose.

6. Análise estatística

Os resultados experimentais foram submetidos à análise estatística por probitos segundo Finney[9]. A combinação de estimativas de potência, a ponderação para cada ensaio e o índice de precisão foram calculados conforme a literatura[3, 8, 9].

RESULTADOS

Para cada ensaio foi registrado o número de animais mortos para a respectiva dose. Estes dados submetidos à análise estatística forneceram os valores de DL50 apresentados nas tabelas 1 e 5 e de potência nas tabelas 2 a 4 e 6 a 8, incluindo as combinações de estimativas dos ensaios independentes.

O primeiro grupo de resultados corresponde às tabelas 1 a 4, onde os valores experimentais de DL50 serviram de base para o planejamento dos ensaios de potência.

DALMORA, S.L., VACCARI, S.F., SAMPEDRO, A.M., PEREIRA, J.E. da S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. **Mem. Inst. Butantan**, v. 54, n.1, p.21-30, 1992.

TABELA 1

Estimativas de DL50 e limites de confiança (P=0,95) em microgramas de veneno de *Bothrops jararaca* por camundongo. Ponderação de cada ensaio independente. Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão (λ).

Ensaio nº	DL50	Limites de confiança (P=0,95)	Ponderação
01	34,72	30,71 — 39,37	1317
02	35,77	31,31 — 41,41	1039
03	33,95	29,32 — 39,95	851
Potência média	34,84	31,18 — 37,74	

λ=0,07 Homogeneidade $X^2=0,23$ $p > 0,05$

TABELA 2

ANTIVENENO A. Estimativas de potência (DE50) e limites de confiança (P=0,95), em mg de veneno de *B. jararaca* neutralizados por ml de antiveneno. Ponderação de cada ensaio independente. Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão (λ).

Ensaio nº	DE50	Limites de confiança (P=0,95)		Ponderação
	(mg/ml)	(mg/ml)	% da potência	
04	7,42	6,54 — 8,38	88,14 — 112,94	1320
05	7,32	5,61 — 8,95	76,64 — 122,27	374
06	7,20	6,31 — 8,25	87,64 — 114,58	1136
Potência Média	7,32	6,72 — 7,97	91,80 — 108,88	

λ=0,07 Homogeneidade $X^2=0,10$ $p > 0,05$

TABELA 3

ANTIVENENO B. Estimativas de potência (DE50) e limites de confiança (P=0,95), em mg de veneno de *B.jararaca* neutralizados por ml de antiveneno. Ponderação de cada ensaio independente. Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão (λ).

Ensaio nº	DE50	Limites de confiança (P=0,95)		Ponderação
	(mg/ml)	(mg/ml)	% da potência	
07	5,88	5,25 — 6,65	89,28 — 113,09	1443
08	6,08	5,31 — 6,97	87,33 — 114,64	1101
09	5,55	4,88 — 6,33	87,93 — 114,05	1201
Potência Média	5,83	5,41 — 6,27	92,79 — 107,55	

$\lambda = 0,06$ Homogeneidade $X^2 = 0,91$ $p > 0,05$

TABELA 4

ANTIVENENO C. Estimativa de potência (DE50) e limites de confiança (P=0,95), em mg de veneno de *B. jararaca* neutralizados por ml de antiveneno. Ponderação do ensaio.

Ensaio nº	DE50	Limites de confiança (P=0,95)		Ponderação
	(mg/ml)	(mg/ml)	% da potência	
10	5,89	5,21 — 6,69	88,45—113,58	1299

Para as avaliações de potência dos antivenenos botrópicos apresentadas nas tabelas 6, 7 e 8, foram empregados os valores de DL50 determinados experimentalmente conforme a Tabela 5.

TABELA 5

Estimativas de DL50 e limites de confiança (P = 0,95) em microgramas de veneno de *Bothrops jararaca* por camundongo.
Ponderação de cada ensaio independente.
Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão (λ).

Ensaio nº	DL50	Limites de confiança (P = 0,95)	Ponderação
11	44,51	35,63 — 55,04	431
12	43,30	37,55 — 50,01	993
Potência média	43,65	38,74 — 49,21	
λ=0,10	Homogeneidade $X^2=0,04$ $p > 0,05$		

TABELA 6

ANTIVENENO A. Estimativas de potência (DE50) e limites de confiança (P=0,95), em mg de veneno de *B. jararaca* neutralizados por ml de antiveneno.
Ponderação de cada ensaio independente.
Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão (λ).

Ensaio nº	DE50	Limites de confiança (P = 0,95)		Ponderação
	(mg/ml)	(mg/ml)	% da potência	
13	7,76	5,59 - 8,72	72,03 - 112,37	414
14	7,38	6,48 - 8,28	87,80 - 112,19	1367
15	6,73	5,38 - 7,71	79,94 - 114,56	633
Potência média	7,27	6,63 - 7,97	91,20 - 109,63	
λ=0,08	Homogeneidade $X^2=1,10$ $p > 0,05$			

TABELA 7

ANTIVENENO B. Estimativas de potência (DE50) e limites de confiança (P=0,95), em mg de veneno de *B. jararaca* neutralizados por ml de antiveneno. Ponderação de cada ensaio independente. Combinação das estimativas e respectivo índice de precisão (λ).

Ensaio nº	DE50 (mg/ml)	Limites de confiança (P=0,95) (mg/ml)	Limites de confiança (P=0,95) % da potência	Ponderação
16	5,88	4,53 - 6,46	77,04 - 109,86	651
17	5,96	5,30 - 6,57	88,92 - 110,23	1762
Potência média	5,94	5,42 - 6,51	91,24 - 109,60	

λ=0,08 Homogeneidade $X^2=0{,}02$ $p > 0{,}05$

TABELA 8

ANTIVENENO C. Estimativa de potência (DE50) e limites de confiança (P = 0,95), em mg de veneno de *B. jararaca* neutralizados por ml do antiveneno. Ponderação do ensaio.

Ensaio nº	DE50 (mg/ml)	Limites de confiança (P = 0,95) (mg/ml)	Limites de confiança (P = 0,95) % da potência	Ponderação
18	5,34	4,69 - 5,98	87,83 - 111,98	1386

DISCUSSÃO

Os resultados experimentais encontrados são classificados em dois grupos correspondentes às tabelas 1 a 4 e 5 a 8, respectivamente. Estes valores foram obtidos com intervalos de tempo, aproximado de 15 meses entre as análises.

Para o primeiro grupo de dados composto pelas tabelas 1 a 4, foi inicialmente determinada a Dose Letal 50 (DL50) do Veneno de Referência de *Bothrops jararaca* que, pela combinação de três ensaios independentes, forneceu um valor médio de 34,84 microgramas por camundongo, tabela 1 (λ=0,07). Este valor foi utilizado para o planejamento dos ensaios de avaliação de potência dos antivenenos.

Para a realização das análises cujos resultados se encontram nas tabelas 5 a 8 foi procedido de modo similar. O mesmo lote de veneno de referência apresentou uma DL50 igual a 43,65 microgramas por camundongo conforme a tabela 5 ($\lambda = 0,10$). Este valor serviu de base para o planejamento das reavaliações de potência dos mesmos antivenenos.

Detectou-se uma variação na toxicidade do veneno de *B. jararaca* que poderia invalidar o ensaio biológico [1, 20]. Então, procedeu-se a repetição dos ensaios de DL50 a fim de utilizar sempre o verdadeiro valor de letalidade no planejamento dos experimentos e no cálculo da potência. Conforme se pode observar nas tabelas 2 a 4 e 6 a 8, a metodologia proporcionou avaliações de potência precisas com estreitos intervalos de confiança e uma variação de, no máximo, 8% em torno da média para um nível de significância $\alpha = 0,05$. A reprodutibilidade e a confiabilidade podem ser notadas nos ensaios completamente independentes, mas principalmente na combinação destas estimativas. O índice de precisão foi calculado pelo lambda de Gaddum obtendo-se valores $\lambda < 0,10$. A ponderação calculada para cada ensaio como a recíproca da variância do log da potência[8] variou entre 374 e 1762. A homogeneidade das estimativas independentes de potência foi calculada pelo teste do χ^2.

Optou-se pela padronização da presente metodologia de acordo com literatura [3, 6, 12, 13, 20], determinando-se inicialmente a DL50 do veneno de *B. jararaca* e então, com base neste resultado, foi avaliada a potência do antiveneno. Adotou-se a mistura de quantidades fixas de veneno na proporção de 5 DL50 e diferentes diluições do antiveneno. De acordo com a curva dose-resposta foram selecionadas 4 a 5 doses em progressão geométrica de modo que um grupo propiciasse 10 — 20% de mortalidade, outro 80 — 90% e, pelo menos um outro, respostas intermediárias. O espaçamento logarítmico foi de 0,097. Embora a pré-incubação da mistura veneno-antiveneno não reproduza as características do envenenamento ofídico, este procedimento é adequado para estudar a presença e a potência de anticorpos neutralizantes nos antivenenos.

A utilização do camundongo como animal de prova em substituição ao pombo, possibilitou a realização de ensaios biológicos reprodutíveis, com maior número de respostas para cada nível de dosagem. Os animais foram deixados em jejum com acesso a glicose a 10% pelo período de 10 a 15 horas, encontrando-se assim maior exatidão nas respostas. Escolheu-se a via intraperitoneal pela sua conveniência e reprodutibilidade, mesmo contrastando com as vias intravenosas e intradérmica que mais de assemelhariam ao processo de acidente ofídico. Os animais foram observados durante 48 horas pois somente neste período os efeitos biológicos são integrais, concordando com as observações de outros autores [6, 14].

Os resultados foram submetidos à análise estatística por probitos segundo Finney [8, 9]. Este procedimento possibilita uma análise mais completa, maiores informações a partir dos dados experimentais, apresentando assim vantagens sobre os métodos simplificados de Spearman-Kärber, Reed-Müench, médias móveis[8, 20] e outros. O desenvolvimento de programas de computação contribui para economia e simplicidade dos trabalhos.

A potência das amostras analisadas segundo esta metodologia é representada pela Dose Efetiva 50 (DE50) e foi expressa em miligramas de veneno neutralizados por mililítro de soro antibotrópico. Este também é o procedimento adotado pelos laboratórios produtores e preconizado pela literatura [12, 14, 20].

Recentemente, o Programa Nacional de Ofidismo da Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde, do Ministério da Saúde, contribuiu diretamente para aprimorar e aumentar a produção de soros antiofídicos no Brasil, bem como pa-

ra uma revisão dos bioensaios empregados para estimar sua potência, buscando adaptar esses métodos às recomendações da Organização Mundial da Saúde [5, 20]. Deste modo, foi estabelecido o Veneno de Referência empregado neste estudo, e os laboratórios produtores nacionais passaram a avaliar a potência dos soros antiofídicos em função de sua capacidade neutralizante em camundongos.

É importante que se continue a desenvolver procedimentos que contribuam para ampliar os conhecimentos dos fenômenos que caracterizam o complexo quadro fisiopatológico do envenenamento ofídico e, ao mesmo tempo acrescentem informações sobre a neutralização de outros efeitos farmacológicos, não só a letalidade. Neste sentido, seria recomendável o estabelecimento do antiveneno padrão e a padronização do ensaio de retas paralelas. Enquanto isto, metodologias como a presente, se destacam pela sua importância e validade na dosagem de potência dos antivenenos botrópicos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Ciro C. de Resende, Coordenador do Programa Nacional de Ofidismo do Ministério da Saúde pelo apoio que viabilizou o presente trabalho. Aos Institutos Butantan, Vital Brazil e INCQS pela doação dos antivenenos e veneno de referência. Ao Téc. de Lab. João L. Rizzi pelo auxílio na parte experimental e à Dra. Yoko Murata pela revisão crítica.

RESUMO: As metodologias para a determinação da Dose Letal 50 (DL 50) do veneno de Referência de *Bothrops jararaca* e para a avaliação de potência do antiveneno botrópico, foram padronizados pela inoculação intraperitoneal em camundongos. Elaborou-se programa de computação que foi utilizado para a análise estatística dos dados pelo método de probitos, encontrando-se uma reprodutibilidade significativa para $\alpha = 0,05$. A ponderação calculada para cada ensaio variou entre 374 e 1762. O índice de precisão foi $\lambda < 0,10$.

UNITERMOS: Antiveneno botrópico, avaliação de potência de antiveneno botrópico, DL50 de veneno botrópico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BANGHAM, D.R. Assays and standards. In: *Hormones and blood.* 3.ed. London: Academic Press, 1983. v. *5*, p. 256-299.
2. BRAZIL, V. Dosagem do valor antitóxico dos seruns antipeçonhentos. *Rev. méd. São Paulo*, v. *10*, p. 457-462, 1907.
3. BRITISH pharmacopoeia. London: Her majesty's Stationery Office, 1988, p. A 163.
4. CHRISTENSEN, P.A. Remarks on antivenin potency estimation. *Toxicon*, v. *5*, p. 143-145, 1967.
5. DINIZ, C.F. Produção de soro antiofídico na Fundação Ezequiel Dias. *Ciênc. Hoje*, v. *9*, n.52, p. 72-73, 1989.
6. EUROPEAN pharmacopoeia. 2.ed. Paris: Maisonneuve, 1987. p. 145.
7. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. p. 1034.
8. FINNEY, D.J. *Statistical method in biological assay.* 3.ed. London: Charles Griffin, 1978. 508p.
9. FINNEY, D.J. *Probit analysis.* 3.ed. Cambridge: Cambridge University, 1971. 333p.
10. FURLANETTO, R.S., ROLIM ROSA, R., SILES VILLARROEL, M., SIRACUSA, Y.Q. Contribuição ao estudo da determinação da DL 50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — Mus musculus — Linnaeus, 1758. I. Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL 50. *Mem. Inst. Butantan*, v. *37*, p. 99-107, 1973.

DALMORA, S.L., VACCARI, S.F., SAMPEDRO, A.M., PEREIRA, J.E. da S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. Mem. Inst. Butantan, v. 54, n.1, p.21-30, 1992.

11. FURLANETTO, R.S., ROLIM ROSA, R., SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F. Contribuição ao estudo da determinação da DL 50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos — Mus musculus — Linnaeus, 1758. II. Possibilidade de determinação da DL 50 através da inoculação prévia de doses infra-letais do próprio veneno. *Mem. Inst. Butantan*, v. *37*, p. 109-122, 1973.
12. GUTIÉRREZ, J.M., ROJAS, G., LOMONTE, B., GENÉ, J.A., CHAVES, F. *La evaluacion de la capacidad neutralizante de los anti-venenos en América*. San José: Instituto Clodomiro Picado. Universidad de Costa Rica, 1990. 21p.
13. KOCHOLATY, F.W., BILLINGS, T.A., ASHLEY, B.D., LEDFORD, E. B., GOETZ, J.C. Effect of the route of administration on the neutralizing potency of antivenins. *Toxicon*, v. *5*, p. 165-170, 1968.
14. SILES VILLARROEL, M., ROLIM ROSA, R., ZELANTE, F., FURLANETTO, R.S. Padronização da avaliação da potência de antivenenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, v. *42/43*, p. 325-336, 1978/79.
15. SILES VILLARROEL, M., ROLIM ROSA, R., ZELANTE, F., GUIDOLIN, R. Evidenciação em camundongos da soroneutralização para — específica entre venenos e antivenenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan*, v. *42/43*, p. 337-344, 1978/79.
16. SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., ROLIM ROSA, R., FURLANETTO, R.S. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, v. *42/43*, p. 311-323, 1978/79.
17. SILES VILLARROEL, M., ZELANTE, F., ROLIM ROSA, R., FURLANETTO, R.S. Padronização da avaliação da atividade necrosante de venenos botrópicos e da potência antinecrosante do antiveneno de *B. jararaca*. *Mem. Inst. Butantan*, v. *42/43*, p. 345-355, 1978/79.
18. SLOTTA, C.H. & SYSZKA, G. Estudos chimicos sobre os venenos ophidicos. I. Determinação de sua toxicidade em camundongos. *Mem. Inst. Butantan*, v. *11*, p. 109-119, 1937.
19. THEAKSTON, R.D. G. & REID, H.A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, v. *61*, n.6, p. 949-956, 1983.
20. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms*. Geneva: WHO, 1981. 44p.

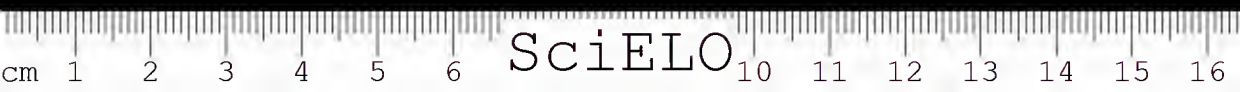
BOLETIM DE BIOTECNOLOGIA

VOLUME 3 — 1992 ISSN 0103-6548

Secretaria de Estado da Saúde
Coordenação dos Institutos de Pesquisa
Instituto Butantan

SUMÁRIO

Bol. Biotecnol., v. 3, p. 1-7 — 1992

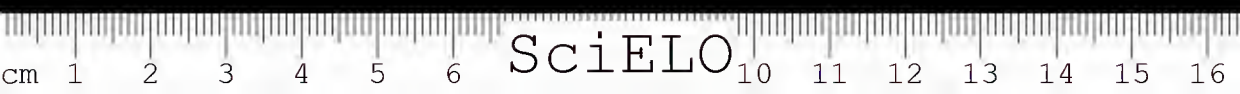
Bol. Biotecnol.
v. **3**, p. 3-7, 1992.

CARACTERIZAÇÃO DE VENENOS DE SERPENTES POR ELETROFORESE EM POLIACRILAMIDA

Ana Maria MOURA DA SILVA

RESUMO: Os venenos de *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops pradoi*, *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collineatus*, *Lachesis muta muta*, *Micrurus frontalis* e *Micrurus corallinus*, foram fracionados por eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida, em presença de SDS e os componentes corados com azul de Coomassie. A comparação do perfil eletroforético desses venenos mostrou que os venenos de *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas* e *B. jararaca* apresentaram um perfil eletroforetico semelhante, com as bandas majoritárias localizadas entre 20 — 30 kDa e 45 — 60 kDa, enquanto os venenos de *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi* apresentaram as bandas majoritárias localizadas entre 10 e 40 kDa. O veneno de *L. m. muta* apresenta um perfil eletroforético bastante complexo, com bandas predominantemente na região de 30 kDa. Os venenos de *C. d. terrificus* e de *C. d. collineatus* apresentaram padrões muito semelhantes. O veneno de *M. frontalis* apresentou um padrão mais complexo que o de *M. corallinus* possuindo um grupo de bandas na região de 20 a 30 kDa. Através desse método, foi possível estabelecer diferenças no perfil eletroforético dos venenos, o que pode auxiliar a classificação sistemática das serpentes.

UNITERMOS: Venenos, serpentes, eletroforese.

Laboratório de Imunopatologia Instituto Butantan — São Paulo — Av. Vital Brasil, 1.500 — 05503-900 — São Paulo, SP — Brasil
Recebido para publicação em 17.10.91 e aceito em 30.3.92.

MOURA DA SILVA, A.M. Caracterização de venenos de serpentes por eletroforese em poliacrilamida. **Bol. Biotecnol.**, v. 3, p. 3-7, 1992.

INTRODUÇÃO

Venenos de serpentes constituem-se em um conjunto complexo de proteínas com diferentes atividades farmacológicas. A análise de proteínas por eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida permite a separação dos componentes revelando um perfil eletroforético com bandas de coloração e migração relativa altamente reprodutíveis. Dessa forma, passamos a investigar a possibilidade da utilização da eletroforese em gel de gradiente de poliacrilamida, na presença de SDS (SDS-PAGE), para a análise de amostras de veneno de serpentes de diferentes espécies. Esta análise dos venenos poderia auxiliar a classificação sistemática das serpentes venenosas, assim como auxiliar na identificação de venenos ofídicos.

Foram utilizados os venenos dessecados de *B alternatus, B. atrox, B. cotiara, B. erythromelas, B. jararaca, B. jararacussu, B. moojeni, B. neuwiedi, B. pradoi, C. d. terrificus, C. d. collineatus, L. m. muta, M. frontalis e M. corallinus*, provenientes da extração de vários exemplares de cada espécie. Soluções-estoque dos venenos foram preparadas em salina, na concentração de 10 mg/ml. Após centrifugação por 5 minutos a 10.000 g, os sobrenadantes foram aliquotados e estocados à temperatura de -70°-C. No momento da utilização, as soluções foram diluídas para a concentração de 1 mg/ml e a concentração protéica aferida por leitura da absorbância a 280 nm. As soluções de venenos foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS[3], em condições não redutoras. Para este fim, os venenos foram diluídos em um mesmo volume de tampão de amostra (Tris/HCl 125 mM, pH 6,8, contendo 2,5% de SDS (dodecil sulfato de sódio), 10% de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol, 1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), 1 mM de TLCK (N-alfa-p-tosil-L-lisil-clorometilcetona) e 10 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) e mantidas em banho-maria fervente por 3 minutos. Amostras de cada veneno contendo 50ug de proteína foram então aplicadas em um gel de empacotamento de 3 cm na concentração de 4% de poliacrilamida e gel de resolução de 9 cm na concentração de 8 a 18% de poliacrilamida e submetidas a eletroforese com corrente constante de 25 mA, em tampão Tris/glicina pH 8,3 contendo 1% de SDS. Os géis foram corados com negro de amido 0,1% em 40% de metanol e 10% de ácido acético e o excesso do corante removido com uma solução de etanol 40% e ácido acético 7%. O peso molecular aparente das bandas foi calculado com base na migração dos seguintes padrões de peso molecular: IgG de camundongo (150 kDa), albumina sérica bovina (68 kDa), ovalbumina (43 kDa), tripsinogênio (24 kDa) e lisozima (14 kDa), também em condições não redutoras.

Os perfis eletroforéticos obtidos após o fracionamento dos venenos de *Bothrops* encontram-se na Figura 1. Os venenos de *B. alternatus, B. atrox, B. cotiara, B. erythromelas e B. jararaca* apresentaram um perfil eletroforético semelhante, com as bandas majoritárias localizadas nas faixas de peso molecular entre 20 — 30 kDa e 45 — 60 kDa. Por outro lado, os venenos de *B. jararacussu, B. moojeni, B. neuwiedi e B. pradoi* apresentaram também um perfil eletroforético semelhante, porém mais complexo, com as bandas majoritárias localizadas entre 10 e 40 kDa, paralelamente a outras bandas distribuídas por todo o gel. Como características particulares desses venenos, podemos acresentar: *B. alternatus* — uma banda forte de 35 kDa; *B. atrox* — duas bandas fracas de 31 e 38 kDa; *B. cotiara* — uma banda forte de 34 kDa, outra de 65 kDa e a ausência de bandas de peso molecular próximo a 15 kDa; *B. erythromelas* — uma banda forte e isolada na região de 15 kDa e duas bandas fortes na região de 60 kDa; *B. jararaca* — uma banda forte de 20 kDa; *B. moojeni* — pequena quantidade de ban-

das acima de 40 kDa e 4 bandas na região de 15 kDa; *B. neuwiedi* — apenas uma banda na região de 15 k Da; os venenos de *B. jararacussu e B. pradoi* apresentaram perfis muito semelhantes podendo ser distintos apenas pela intensidade relativa da coloração das bandas.

Na Figura 2 temos os perfis eletroforéticos dos venenos de *L. m. muta, C. d. terrificus, C. d. collineatus, M. frontalis e M. corallinus*. O veneno de *L. m. muta* apresenta um perfil eletroforético bastante complexo, com bandas predominantemente na região de 30 kDa. Uma característica peculiar desse veneno é a presença de uma banda difusa de baixo peso molecular (8 kDa). Os venenos de *C.d. terrificus* e de *C. d. collineatus* apresentaram padrões muito semelhantes, com variações apenas quanto a intensidade de coloração de algumas bandas minoritárias, não sendo possível a distinção dos mesmos por este método. A banda principal desses venenos apresenta um peso molecular aparente de 16kDa. Os venenos de *Micrurus* possuem um perfil eletroforético mais simples, com poucas bandas distribuídas por todo o gel e uma banda majoritária de 48 kDa. O veneno de *M. frontalis* apresentou um padrão mais complexo que o de *M. corallinus* possuindo um grupo de bandas na região de 20 a 30 kDa. Alguns venenos de *Bothrops, Crotalus e Lachesis,* provenientes de extrações mais antigas, foram testados por esse método, reproduzindo perfis eletroforéticos muito semelhantes aos aqui apresentados, com variação apenas na intensidade da coloração de algumas bandas (não mostrado).

Através desse método, foi possível estabelecer diferenças no perfil eletroforético dos venenos. Entretanto, é importante a utilização de gel de gradiente de poliacrilamida. Em gel de concentração fixa, as bandas de peso molecular próximo a 15 kDa. apresentam-se como um bloco, e é esta a localização onde ocorre o maior número de diferenças nas bandas.

Por outro lado, já foi demonstrada a variação quantitativa de componentes de venenos de uma mesma espécie segundo a localização geográfica[2,4] ou a idade[1] dos animais. Estas variações podem refletir em alterações do perfil eletroforético, as quais não foram analisadas neste trabalho. Entretanto, a utilização do método para a análise de venenos provenientes da extração de vários exemplares de uma mesma espécie nos parece válida, uma vez que essas variações quantitativas seriam compensadas, resultando em perfis eletroforéticos com diferenças apenas na intensidade de coloração de algumas bandas.

ABSTRACT: Venoms of *Bothrops alternatus, Bothrops atrox, Bothrops cotiara, Bothrops erythromelas, Bothrops jararaca, Bothrops jararacussu, Bothrops moojeni, Bothrops neuwiedi, Bothrops pradoi, Crotalus durissus terrificus, Crotalus durissus collineatus, Lachesis muta muta, Micrurus frontalis and Micrurus corallinus*, were fraccionated by gradient polyacrylamide gel electrophoresis with SDS and stained by Coomassie blue. Electrophoresis of these venoms showed that *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas* and *B. jararaca* venoms have a similar pattern, with the major bands located between 20 — 30 kDa and 45 — 60 kDa. Venoms of *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* and *B. pradoi* showed the major bands between 10 and 40 kDa. *L. m. muta* venom showed a complex electrophoretic pattern, with the major bands close to 30 kDa. Venoms of *C. d. terrificus* and *C. d. collineatus* possessed very similar patterns while *M. frontalis* venom showed a more complex pattern than *M. corallinus* venom, with many bands between 20 and 30 kDa. Using this approach, it is possible to detect differences in the electrophoretic pattern of venoms from different spe-

cies of snakes. This observations may help in the current methods used for snake classification.

KEYWORDS: Venoms, snakes, electrophoresis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FURTADO, M.F.D. Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* (Hoge, 1965) (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) em função da idade das serpentes. São Paulo, 1987. [Tese de Doutoramento — Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo].
2. GLEEN, J. L. & STRAIGHT, R. C. Intergradation of two different venom populations of the mojave rattlesnake *(Crotalus scutulatus scutulatus)* in Arizona. *Toxicon*, v. *27*, p. 411, 1989.
3. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. *227*, p. 680, 1970.
4. SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. *Science*, v. *129*, p. 1361, 1959.

MOURA DA SILVA, A.M. Caracterização de venenos de serpentes por eletroforese em poliacrilamida. Bol. Biotecnol., v. 3, p. 3—7, 1992.

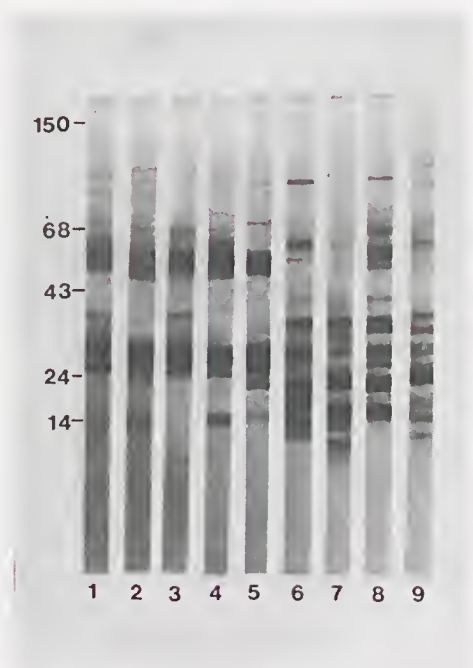



Fig. 1: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS VENENOS.
Os venenos de *B. alternatus (1)*, *B. atrox (2)*, *B. cotiara (3)*, *B. erythromelas (4)*, *B. jararaca (5)*, *B. jararacussu (6)*, *B. moojeni (7)*, *B. neuwiedi (8)* e *B. pradoi (9)* foram fracionados por SDS-PAGE e as proteínas coradas com negro de amido. Os números à esquerda indicam a posição da migração dos marcadores de peso molecular.

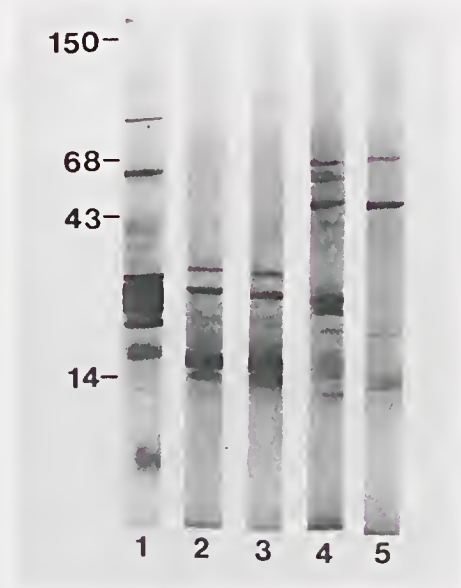



Fig. 2: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS VENENOS.
Os venenos de *L. m. muta (1)*, *C. d. terrificus (2)*, *C. d collineatus (3)*, *M. frontalis (4)* e *M. corallinus (5)* foram fracionados por SDS-PAGE e as proteínas coradas com negro de amido. Os números à esquerda indicam a posição da migração dos marcadores de peso molecular.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1. Somente serão aceitos trabalhos inéditos e que se destinem exclusivamente à revista. É proibida a reprodução com fins lucrativos. Os artigos de revisão serão publicados a convite da Comissão Editorial.
2. Os trabalhos deverão ser redigidos em português, inglês ou francês, datilografados preferencialmente em máquina elétrica, em espaço duplo em 3 (três) vias, em papel formato ofício e numerados no ângulo superior direito.
3. No preparo do original será observada, sempre que possível, a seguinte estrutura: **Página de rosto:** título do artigo, nome(s) do(s) autor(es) e filiação científica. **Texto:** introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referência bibliográfica. **Material de referência:** resumos (em português e inglês); **unitermos** (palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo; devem ser incluídas até um limite máximo de três, em português e inglês).
4. As referências bibliográficas deverão ser ordenadas alfabeticamente e numeradas.
   Exemplos:
   Para livros: autor, título, edição, local de publicação, editor, ano, páginas.
   7. BIER, O. **Microbiologia** e **imunologia.** 24ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Para artigos: autor, título do artigo, título do periódico, volume, página inicial e final, ano.
   8. MACHADO, J.C., SILVEIRA Fº, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem. Inst. Butantan, v.40/41**, p. 1-9, 1976/77.
   As citações no texto devem ser por números-índices correspondentes às respectivas referências bibliográficas.
   Exemplos:
   ...método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ...segundo vários autores[2,3,4]
5. As ilustrações (fotos, tabelas, gráficos etc.) deverão ser originais e acompanhadas de legendas explicativas. As legendas serão numeradas e reunidas em folha à parte. Os desenhos deverão ser a nanquim e as fotografias bem nítidas, trazendo no verso o nome do autor e a indicação numérica da ordem a ser obedecida no texto. As ilustrações deverão ser organizadas de modo a permitir sua reprodução dentro da mancha da revista (22 x 12,5cm).
6. Os artigos deverão conter no máximo 6 (seis) ilustrações (branco e preto). De cada trabalho serão impressas 30 (trinta) separatas, sendo 10 para a Biblioteca do Instituto e 20 para os autores.
7. Os textos originais não serão devolvidos e os originais das ilustrações estarão à disposição dos autores.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

1. Manuscripts submitted to the Editorial Board should be unpublished texts and should not be under consideration for publication elsewhere. Reproduction for commercial purposes is not allowed. The Editorial Board will plan the publication of revision articles.
2. The original and two copies of papers should be typewritten in Portuguese, English or French, double spaced, on typing paper (31 x 21cm). Pages should be numbered consecutively at the upper right corner.
3. The following structure should be considered in the preparation of the manuscript: **Title page:** with article title, name of author(s), professional address. **Text:** with introduction, material and methods, results, discussion, conclusions, acknowledgments, references, abstracts (in Portuguese and English), and keywords. A maximal number of 03 keywords should be included in Portuguese and English.
4. References in alphabetical order should be numbered consecutively.
   Examples:
   Books
   7.BIER, O. **Microbiologia** e **imunologia.** 24.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
   Articles
   8. MACHADO,J.C., SILVEIRA Fº, J.F. Obtenção experimental da pancreatite hemorrágica aguda no cão por veneno escorpiônico. **Mem.Inst. Butantan, v.40/41**, p. 1-9, 1976/77.
   Citations in the text should be identified by the reference number.
   Examples:
   ...método derivado de simplificação de armadilha de Disney[1]
   ...segundo vários autores[2,3,4]
5. Illustrations (photographs, tables, figures etc.) should be the originals and legends should be submitted typewritten on a separate sheet. Line-drawings should be with China ink and photographs must be of top quality. On the back of each figure of photograph the name of the author(s) should be lightly written and the number indicating the sequence in the text. Illustrations should fit in a page measuring 22 x 12,5cm.
6. No more than 6 illustrations will be accepted and photographs should be black and white. Thirty reprints of each article are provided without charge, and 10 will be kept at the library.
7. Submitted manuscripts will not be returned to the author(s) but the original illustrations are available to author(s) by request.